

# 「研究力増進プログラム - 細胞培養基礎実習 -」の報告

## Research Enhancement Program - Cell Culture Basics Training -

生命歯学部	那 須 優 則
	小 林 朋 子
	三 橋 扶佐子
	戸 円 智 幸
	鳥 居 大 祐
	深 田 哲 也
コーニングインターナショナル(株)	江 藤 哉 子
生命歯学部	筒 井 健 夫

Masanori NASU<sup>1</sup>, Tomoko KOBAYASHI<sup>2</sup>, Fusako MISTUHASHI<sup>1</sup>, Toshiyuki TOEN<sup>1</sup>,  
Daisuke TORII<sup>3</sup>, Tetsuya FUKADA<sup>3</sup>, Kanako ETOH<sup>4</sup> and Takeo TSUTSUI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Natural Science & Research Center for Odontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo,  
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

<sup>2</sup> Research Center for Odontology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo,  
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

<sup>3</sup> Department of Pharmacology, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo,  
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0071, Japan

<sup>4</sup> Corning International K. K., Life Sciences  
1-11-44 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

**Abstract:** Cell culture is an essential research method not just for basic research in molecular biology, but also for a wide range of life science fields, including regenerative medicine and drug discovery. However, there is a risk that inexperienced researchers may mistakenly believe that cells will proliferate if all procedures are carried out according to the instructions in manuals or the age-old methods used in their laboratories. For this reason, in 2017 and 2018 the Research Center for Odontology conducted basic cell culture training in collaboration with the Department of Pharmacology, based on the “Fundamental principles of cell culture” proposed by the Japanese Tissue Culture Association, as a program to enhance research capabilities.

**Key words:** aseptic technique for cell culture, passaging cells, freezing cells, cell culture basics training

(2021年 3月12日 受理)

## 実習の実際

### 1. 参加者

(2017年度 研究力増進プログラム (18))

事前実習に6部署から18名(教授2名、講師1名、助教1名、書記1名、技術職員1名、大学院生12名)、細胞培養基礎実習に18名(教授2名、講師2名、助教2名、書記1名、大学院生11名)参加した(18名のうち14名は事前実習と細胞培養基礎実習の両方に参加)。18名を1グループ6名とし3グループに分けた。

(2018年度 研究力増進プログラム (19))

参加人数を6名までとした。事前実習、細胞培養基礎実習に4部署から6名(助教1名、大学院生5名、技術職員1名)参加した。募集人数を超過したため8名が見学者として参加した。

### 2. 実習

2018年度の実習に用いたテキスト(抜粋)を掲載する。図1～図3に目次、日程表、タイムスケジュールをそれぞれ示す。

## 目 次

### 日 程 表

#### タイムスケジュール

#### 【事前実習】

ピペッター(ピペットコントローラー)の使い方  
マイクロピペットの使い方  
細胞計数盤の使い方

#### 【細胞培養基礎実習】

ーベーシック カルチャー テクニクー

1. 細胞培養の準備  
使用器具  
細胞培養関連試薬・培地  
顕微鏡・遠心機  
CO<sub>2</sub>インキュベーター  
クリーンベンチ内
2. 細胞の観察・培地の交換  
準備する器具・試薬  
プロトコール
3. 細胞の解凍と培養  
準備する器具・試薬  
プロトコール
4. 細胞の継代・細胞計測  
準備する器具・試薬  
プロトコール
5. 細胞の凍結保存  
準備する器具・試薬  
プロトコール

図1 テキスト目次

## 日 程 表

〈チーフ・インストラクター〉

筒井 健夫(薬理学)

江藤 哉子(コーニングインターナショナル(株))

〈インストラクター〉

鳥居 大祐(薬理学)、小林 朋子(薬理学)、那須

優則(研究センター)、戸円 智幸(研究セン

ター)、深田 哲也(研究センター)、三橋 扶佐

子(研究センター)

〈内容〉

ー事前実習ー

共同利用研究センター 実験室2

(100周年記念館 地下1階)

(1) ピペッター(ピペットコントローラー)  
の使い方

(2) マイクロピペットの使い方

(3) 細胞計数盤の使い方

ー実習ー

第5会議室(100周年記念館6階)

薬理学研究室(本館5階)

(1) 細胞培養の準備

(2) 細胞の観察・培地の交換

(3) 細胞の解凍

(4) 細胞の継代・細胞計測

(5) 細胞の凍結

図2 日程表

## タイムスケジュール

### 1日目

- |       |  |
|-------|--|
| 10:00 | 受講生・講師紹介<br>講義                         |
| 10:50 | 休憩・移動                                  |
| 11:00 | 実習<br>手洗い<br>細胞培養試薬、機器、器具の説明<br>基礎培地調整 |
| 12:00 | お昼休み                                   |
| 13:00 | 実習<br>細胞計測の練習                          |
| 14:00 | 実習<br>細胞観察と培地の交換<br>凍結細胞の解凍と培養         |
| 17:00 | 終了予定                                   |

### 2日目

- |       |                           |
|-------|---------------------------|
| 9:00  | 実習<br>細胞継代                |
| 12:00 | お昼休み<br>(アンケート配布、実習終了時回収) |
| 13:00 | 実習<br>細胞の凍結<実習確認>         |
| 17:00 | 終了予定                      |

図3 タイムスケジュール

## 事前実習

### 1. ピペッター（ピペットコントローラー）の使い方

#### Key points

- ①ポジショニング：肘を固定すると安定します。と姿勢
- ②液体を吸引する：ピペットの先端を吸引速度に合わせて下げましょう。
- ③液体を排出する：排出速度に合わせながら、液面とピペットの先端の距離を保ちましょう。
- ④ピペッティング：液面とピペットの先端を同調させましょう。
- ⑤培地を排出する：残りわずかになったら、ピペットの先端を液面のチューブ壁近くに移動させ、培地をゆっくり排出します。

ピペッターは培地などを適量加えたり、除いたりにするために使用します。主流のピペッターは充電式の電動型で、内部にはメンブレンフィルターが備えられており、液体のピペッター内部への吸い込みを防止する構造になっています。

今回使用するピペッターは、液体を上部のボタンを押して吸い上げ、下部のボタンを押して排出するタイプです。速度を調節できる機種もあります。

#### -ベーシック テクニック-

##### 1 液体を吸引するとき

- 1) ピペッターを持つ手（利き手）の肘は固定しておく、ピペットの先端が安定するため、作業が効率的になります。
- 2) 液体にピペットの先端を挿入し、吸引しながらピペットの先端を下げましょう。
- 3) その際、空気を吸わないように気を付けましょう。
- 4) 目的量より少し多めに吸い上げ、ピペットを垂直にし、排出しながら目的量に合わせましょう。

##### 2 液体を排出するとき

- 1) ピペットと容器底面を適切な距離に保ち、静かに排出しましょう。
- 2) 遠心チューブにピペットを挿入し液体を加える際、ピペットを排出速度に合わせて上げないと、液体がチューブから溢れることがあります。液面にピペットの先端をつけ、排出速度に合わせながらピ

ペットの先端を上げましょう。

- 3) 培地交換では、培地が細胞面層に直接当たらないようにディッシュやフラスコの壁を使い培地を入れてください。細胞種や状態によっては、培地を排出する勢いだけで細胞が剥がれてしまうことがあります。

#### -アドバンス テクニック-

##### 1 ピペッティング

- 1) ピペッティングは正確に細胞数を計測し、均一に細胞を播種（ディッシュやフラスコに播く）するために、細胞を培地と混和しシングルセル（単一細胞）にする操作です。
- 2) 細胞浮遊液を適量吸い上げたピペットをチューブに挿入し、培地を排出する速度とピペット先端を上げる速度を合わせます。ピペット内の液を約4/5排出し、チューブ内の液を同量程度吸い上げます。これを数回繰り返します。
- 3) 大切なポイントは、液面の上下とピペットの先端を同調させることです。泡が立たないように気を付けてください。
- 4) 慣れてきたら、チューブとピペットを少し傾けて両肘を固定してピペッティングすると操作が安定します。
- 5) ピペッティングの回数は、細胞種やその時の状態で変化します。使用する細胞種に合わせて、ある程度決めておくと再現性が得られます。

##### 2 培地を排出するとき

- 1) 粘稠性のある培地（血清入り）を排出する際、ピペットの先端に培地が残留することがあります。
- 2) ピペットから培地を排出し、残りわずかになったら、ピペットの先端を液面のチューブ壁近くに移動させ、ゆっくり排出します。
- 3) ピペットの種類にもよりますが、ピペットの内壁に残留する培地の量を知っておくと、扱う細胞数が少ない実験では再現性が得られます。

## 2. マイクロピペットの使い方

### Key points

- ①ポジショニング：自分の正面で作業し肘を固定すると安定します。
- ②液体を吸引するとき：プッシュボタンを第一ストップまで押し込み、液面にチップの先端を挿入します。吸引はプッシュボタンをゆっくりと戻し、液体を吸引します。
- ③液体を排出するとき：ゆっくりとプッシュボタンを第二ストップまで押し込み、液体を排出します。液面のチューブ壁近くにチップの先端を移動させ、液体をゆっくりと排出し数秒待ちます。
- ④ピペッティング：操作はゆっくりと行いましょう。（泡立ち、チップ内フィルター汚染等防止のため）

マイクロピペットは、少量（ $1\mu\text{L}$ から $1,000\mu\text{L}$ （ $1\text{mL}$ ））の液体を対象としています。今回の実習では、 $20\mu\text{L}$ から $100\mu\text{L}$ までの液量を分取するマイクロピペットを使用します。主な各部の名称を図4に示します。

### ベーシックテクニック

#### 1 ポジショニングと姿勢（図5）

- 1) 自分の正面で作業をするとやりやすいです。
- 2) マイクロピペットを持つ手（利き手）の肘は、机などに固定しておくとチップの先端が安定するため、作業が効率的になります。

#### 2 容量の設定

- 1) 容量設定を減少させる場合  
希望する設定値を超えないように、ゆっくりとサムホイールを回して合わせます。
- 2) 容量設定を増加させる場合  
希望する設定値からさらに1/3回転させ、ゆっくりとサムホイールを戻して合わせます。

#### 3 チップの装着

- 1) 気密性と安定性を確保するために、少しひねるようにしてしっかり固定させてください。

## 4 液体を吸引するとき（図6）

- 1) 液体がよく混和されていることを確認してください。

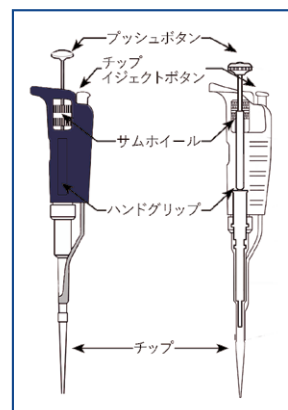


図4 マイクロピペット  
GILSON ピペットマン P,F  
取扱説明書より  
(エムエス機器㈱発行、  
2010年10月)



図5 ポジショニングと姿勢

- 2) プッシュボタンを第一ストップまで押し、マイクロピペットを垂直に持ち、チップを液体に浸し、プッシュボタンをゆっくりと戻しましょう。
- 3) その際、空気を吸わないように気を付けましょう。（泡を立てないように）
- 4) 設定した量を吸引するまで待ちましょう。目視でも確認しましょう。

#### 5 液体を排出するとき（図6）

- 1) 容器壁面にチップをつけるか、もしくは底面と適切な距離をとり静かに排出しましょう。
- 2) 液体に加える際は、液面にチップの先端をつけ、液面上昇とチップの先端を同調させましょう。
- 3) 排出する際は、第二ストップまで押し込み、そのままチップを液体から引き上げます。

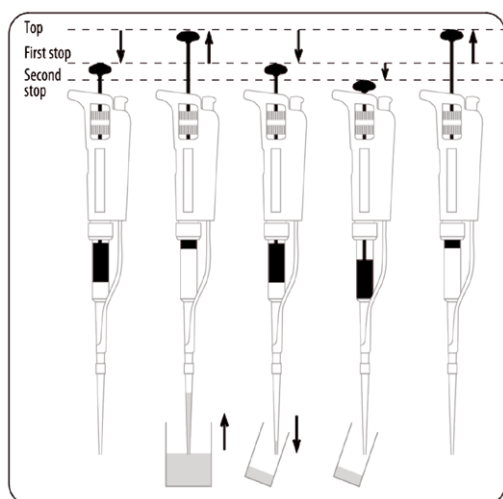


図6 ピペットの動作 -吸引と吐出-  
GILSON ピペットマン P, F 取扱説明書より  
(エムエス機器㈱発行、2010年10月)

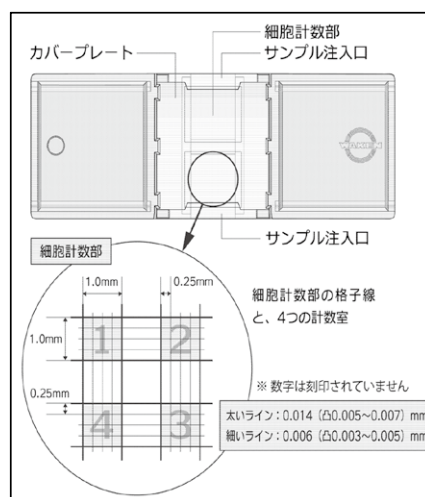


図7 ワケンカウンター概要  
ワケンカウンター取扱説明書より  
(ワケンビーテック㈱発行)

## -アドバンス テクニク-

### 1 ピペッティング

- 1) チップは汚染を防止するためにフィルター入りをお勧めします。
- 2) マイクロピペットのピペッティングは、ゆっくりと行ってください。急な操作は、泡立ち、チップ内フィルターの汚染の原因となります。
- 3) 液体の状態を観察しながら行ってください。
- 4) 粘稠性のある液体や、有機溶媒などは特に注意して行ってください。

### 2 粘稠性のある液体を排出するとき

- 1) チップの先端に液体が残留しやすいので注意してください。
- 2) チップの先端を液面のチューブ壁近くに移動させ、液体をゆっくりと排出します。そしてチップを液体から抜いてください。
- 3) 液体の種類別に、チップの内壁に残留する量を知っておくと、再現性が得られます。

## 3. 細胞計数盤の使い方

細胞浮遊液の細胞数は細胞計数盤で計測します。

## -ベーシック テクニク-

### 1 細胞計数盤へのアプローチ

- 1) ピペッティングにより細胞浮遊液を均一にしてください。
- 2) 50  $\mu$  Lの細胞浮遊液と50  $\mu$  Lのトリパン

ブルー (0.4% in PBS) をよくピペッティングしてください。

- 3) 50  $\mu$  Lの混和液を細胞計数盤へ流し込んでください。

### 2 細胞数の計測

- 1) 細胞計数部に太い線でくくられた4つの細胞計数室があります。これを1、2、3、4とします。それぞれの区画には縦に太い線が両脇に、また細かい線が3本その間にあります。横線も同様に3本あり、太い線に囲まれた正方形は1辺1.0mmです (図7)。
- 2) 一区画の面積は1.0mm  $\times$  1.0mmで1 mm<sup>2</sup>となります。深さは0.1mmですので、体積は1 mm<sup>2</sup>  $\times$  0.1mmで0.1mm<sup>3</sup> (1  $\times$  10<sup>-4</sup> mL) となります。
- 3) 顕微鏡観察で、透明で周囲が光っているのが生細胞です。また青色に染まっているのが死細胞です。
- 4) 正方形の4辺の太い格子線上の細胞は、左と上の2本の線上は数え、その他の2本 (右、下) の2本の線上は数えないようにしてください (図8)。
- 5) ゆっくり数えていると、死細胞の数が増えます。迅速に数えましょう。さらに放置しておくと、乾燥しますので注意してください。
- 6) 4区画の細胞の合計をNとすると、1区画の平均細胞密度は (N/4)  $\times$  10<sup>4</sup> cells/mLとなります (図7)。



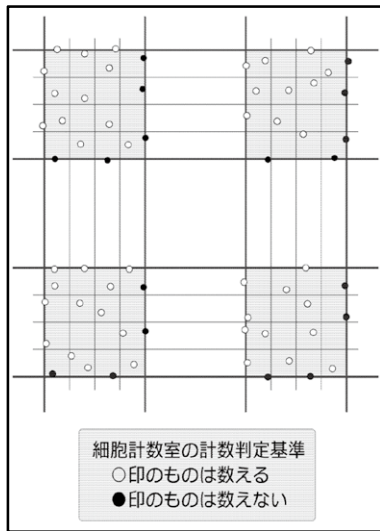


図8 計測部拡大図  
ワケンカウンター取扱説明書より  
(ワケンピーテック㈱発行)

$1\text{cm}^3$  (1立方センチメートル) は1 mL  
 $1\text{mm}^3$  (1立方ミリメートル) は0.001 mL  
 $0.1\text{mm}^3$  は0.0001 mL ( $1 \times 10^{-4}$  mL)

- 7) 混和液は細胞浮遊液と同量のトリパンブルーを加えて2倍希釈されていますので、算出数を2倍してください。細胞浮遊液密度は  $(N/4) \times 2 \times 10^4$  cells/mL となります。例えば、一区画あたりの平均細胞が15個とします。  $3 \times 10^5$  ( $15 \times 2 \times 10^4$ ) cells/mL となります。細胞浮遊液の容量を乗じると全細胞数が算出されます。例えば、この細胞浮遊液 5 mL の細胞数は  $1.5 \times 10^6$  ( $15 \times 10^4 \times 2 \times 5$ ) cells となります。

#### ーアドバンス テクニックー

##### 1 カウント

- 1) 生細胞と死細胞をカウントする際、右手のカウンターは生細胞、また左手のカウンターは死細胞をカウントすると早く数えることができます。
- 2) カウンターにつられないよう正確に数えてください。
- 3) カウントは5分以内で行えるようにしましょう。
- 4) 生細胞であっても、細胞の大きさや形を観察できるようになります。

##### 2 細胞計数盤の種類

- 1) 細胞計数盤には種類があります。それぞれの説明書に従って行ってください。

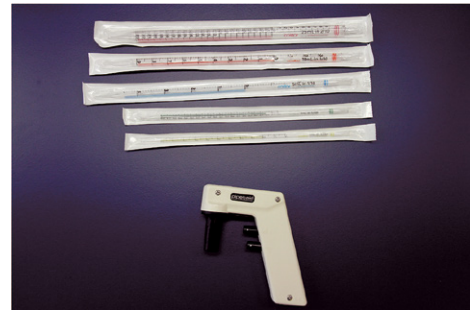


図9-1 ピペッター、各種ピペット

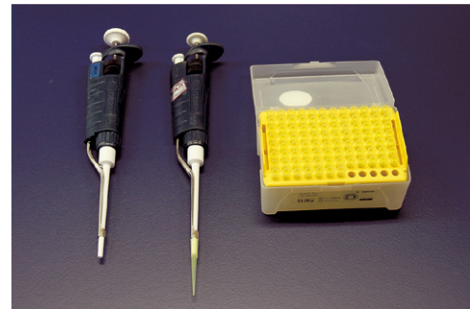


図9-2 マイクロピペット、チップ

- 2) 同じ製品を使用した方が再現性が得られます。予備実験などで確かめましょう。

#### 細胞培養基礎実習

##### ーベーシック テクニックー

##### 1. 細胞培養の準備

###### 1 器具・消耗品 (図9-1～図9-3)

- 1) 器具 (設備機器以外)
  - ・ピペッター  
[Drummond 社 Pipet Aid XP型]
  - ・マイクロピペット  
[GILSON社 Pipetman CLASSIC]
  - ・チューブ立て  
(1.5mL、15mL、50mL チューブ用)
- 2) 消耗品
  - ・デイスポーザブルピペット  
(1 mL～10mL)
  - ・チップ
  - ・凍結用チューブ
  - ・チューブ (15mL、50mL)
  - ・マイクロチューブ (1.5mL)
  - ・細胞計数盤
  - ・25cm<sup>2</sup> フラスコ (T-25)
  - ・φ10cm シャーレ



図9-3 25cm<sup>2</sup>フラスコ (T-25)、φ10cmシャーレ



図9-4 トリプシン・EDTA、PBS (-)



図9-5 DMSO



図9-6 MEM (培地)、血清

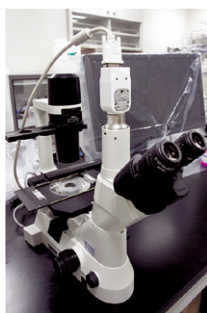


図9-7 倒立顕微鏡

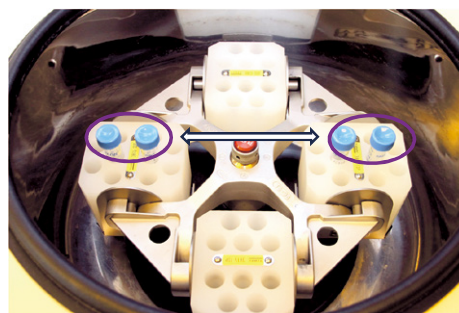


図9-8 遠心機バケット

## 2 細胞培養関連試薬・培地

(図9-4～図9-6)

### 1) 細胞培養関連試薬

- ・0.25%トリプシン/0.02% EDTA/PBS(-)  
(トリプシン・EDTA)
- ・PBS(-)
- ・DMSO(Dimethyl sulfoxide)

### 2) 培地 (培養液)

- ・MEM(Minimum Essential Media、冷蔵庫に保存し、室温に戻す)
- ・血清 (FBS: ウシ胎仔血清)  
室温に20分程おき、その後ウォーターバス (37℃) で解凍する。熱し過ぎは非働化してしまうので気を付ける。  
(※非働化: 56℃、30分で血清中の補体成分が不活化)  
今回はMEMにFBSを加え10%にした培

地を使用する。

## 3 顕微鏡・遠心機

### 1) 顕微鏡 (図9-7)

- ・位相差リング内に光が届いているか確認する。
- ・位相差のリングの表示と倍率が一致していることを確認する。
- ・シャーレやフラスコを載せるステージや、フォーカスを調整するダイヤル、光源スイッチなどは、キムワイプに消毒用アルコールを噴霧し清拭する。

### 2) 遠心機 (図9-8)

- ・バケットはこれから使用するチューブの大きさに合わせる。
- ・バケットがしっかりと挿入されているか確認する。
- ・サンプルと同重量のバランス用チューブ

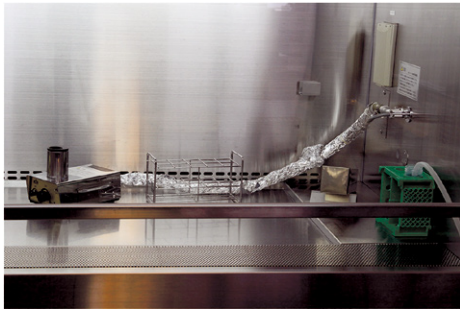
図9-9 CO<sub>2</sub>インキュベーター

図9-11 クリーンベンチ(実験準備)

を点対称に配置する。

- ・遠心機は回転数が設定値に到達するまでその場で確認する。
- ・異音と振動がないか注意する。

#### 4 CO<sub>2</sub>インキュベーター (図9-9)

- ・CO<sub>2</sub>濃度 (5%) を確認する。
- ・温度 (37℃) を確認する。
- ・加湿トレイの中には水が満たされているか確認する。
- ・カビなどの雑菌や汚れがないか確認する。

#### 5 クリーンベンチ内 (図9-10、図9-11)

- ・ガスバーナーを確認する。
- ・奥から手前に向けて、消毒用アルコールを噴霧したキムワイプ等で清拭する。
- ・ガラスなどが汚れていたら清掃する。
- ・実験に必要なものはクリーンベンチ内に入れない。
- ・作業を行いやすいように実験器具や細胞のフラスコなどの配置に注意する。  
※手がフラスコや培地ボトルの上を通らないように配置を工夫をすると、作業効率が上がり、コンタミネーションを防ぐことができる。

### 2. 細胞の観察・培地の交換

#### Key points

#### 1 準備する器具・試薬

##### 1) 器具

- ・ピペッター



図9-10 クリーンベンチ(使用前)

- ・パストゥールピペット
- ・デイスポーザブルピペット (5 mL × 1、10mL × 1)

#### 2) 試薬

- ・培地 (室温)

#### 2 プロトコール

##### 1) 細胞の観察 (図10-1～図10-3)

- (1) CO<sub>2</sub>インキュベーターからシャーレを慎重に取り出す。
- (2) 培地の色を観察する。
- (3) シャーレを顕微鏡ステージに載せる。

#### 【観察のポイント】

- 1 細胞数・密度 (増えているのか)
- 2 浮遊細胞の存在と量 (細胞が浮いているか、またその量)
- 3 細胞の形態
- 4 細胞の局在 (シャーレ内で細胞が偏って播種・増殖していないか)
- 5 分裂している細胞の割合
- 6 コンタミネーションの有無

##### 2) 培地の交換 (図10-4～図10-8)

- (1) 観察したシャーレをアルコール綿で清拭し、クリーンベンチ内へ移動する。
- (2) シャーレの蓋を外し、上向きに置く。
- (3) パストゥールピペットで培地を吸引する。(細胞に直接当てず、シャーレを少し傾けて吸引する。)
- (4) 培地をデイスポーザブルピペットで10mL吸引し、ゆっくりとシャーレに加える。  
※勢いよく細胞に当てると、細胞が剥がれることがある。  
※泡を立てるとコンタミネーションの原因となる。
- (5) 細胞を観察後トレイに載せて、CO<sub>2</sub>インキュベーターへ戻す。



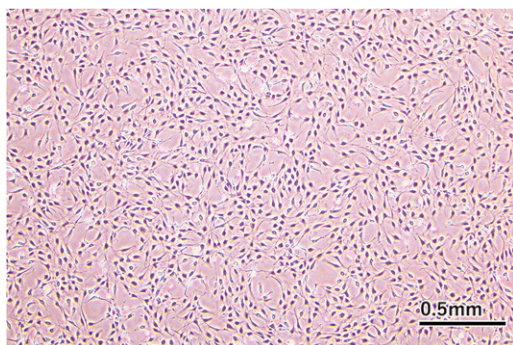


図10-1 細胞の状態(対物レンズ ×4)

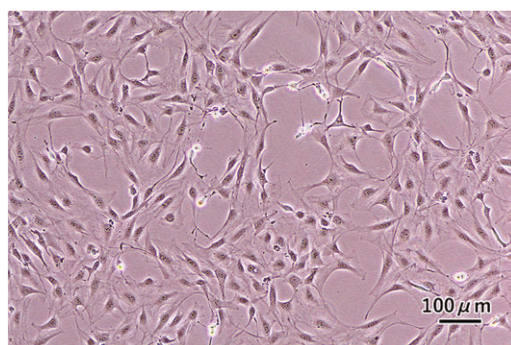


図10-2 細胞の状態(対物レンズ ×10)

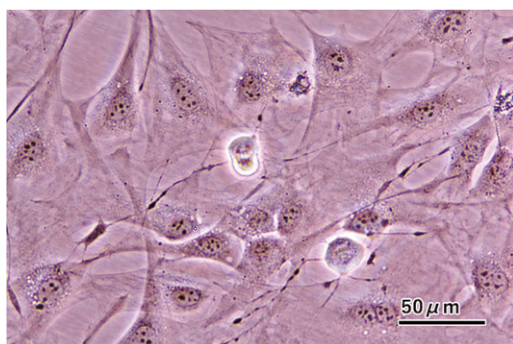


図10-3 細胞の状態(対物レンズ ×40)



図10-4 培地用ボトル



図10-5 フラスコから古い培地の吸引

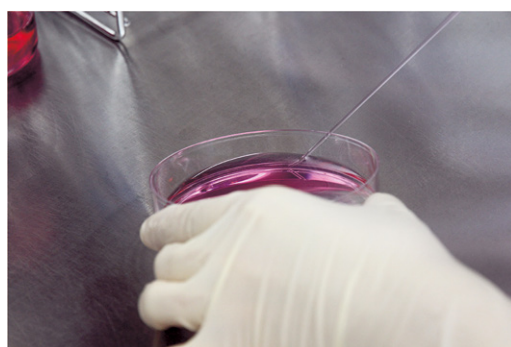


図10-6 シャーレから古い培地の吸引



図10-7 フラスコへ新しい培地の注入



図10-8 シャーレへ新しい培地の注入

## 3. 細胞の解凍と培養

## Key points

- ①凍結部分が米粒大程になるまで
- ②解凍細胞ペレットをタッピング
- ③細胞をよく分散

## 1 準備する器具・試薬

## 1) 器具

- ・ピペッター
- ・パスツールピペット
- ・ディスポーザブルピペット (2 mL × 1、5 mL × 4、10 mL × 3)
- ・25cm<sup>2</sup> フラスコ (T-25) × 1
- ・φ10cm シャーレ × 1
- ・遠心チューブ (15 mL × 1)
- ・チューブ立て
- ・保温槽 (37℃)

## 2) 試薬

- ・ 培地 (室温)

## 2 プロトコル (図11-1)

- (1) 遠心チューブ (15 mL) に培地 9 mL を入れる。
- (2) 凍結細胞を解凍する。(図11-2)

## 【解凍の注意点】

- 1 液体窒素凍結細胞保存容器から凍結用チューブを取り出す時は、フェイスガード、保護用手袋、エプロンを着用する。
- 2 凍結用チューブの下1/3～1/2を保温槽 (37℃) に浸し、ゆっくりと揺らす。
- 3 凍結部分が米粒大程になるまで解凍する。(保温槽とクリーンベンチまでの距離も考慮する)
- 4 保温槽から何度もチューブをあげての解凍の確認はしない。

- (3) 凍結用チューブの細胞浮遊液を遠心チューブ (培地入り) へ移しピペッティングする。
- (4) 遠心分離する。(190 × g [1,000 rpm]、3分) (図11-3)
- (5) 手順 (4) の最中に培地をフラスコおよびシャーレに各2.5 mL 入れる。
- (6) プロトコル No.、細胞名、継代数、日付、氏名を油性ペンで上面に記入する。(フラスコは横、シャーレは細胞を播種する容器の側面にも記載する)
- (7) 遠心分離後、チューブの上清を吸引し、細胞ペレットをタッピングによりほぐ

す。

- (8) 培地を10 mL 入れてピペッティングする。
- (9) 細胞浮遊液を T-25 に 2.5 mL、シャーレに 7.5 mL 入れる。
- (10) 細胞をよく分散させる。
- (11) 細胞の状態を顕微鏡で確認し、CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養する。

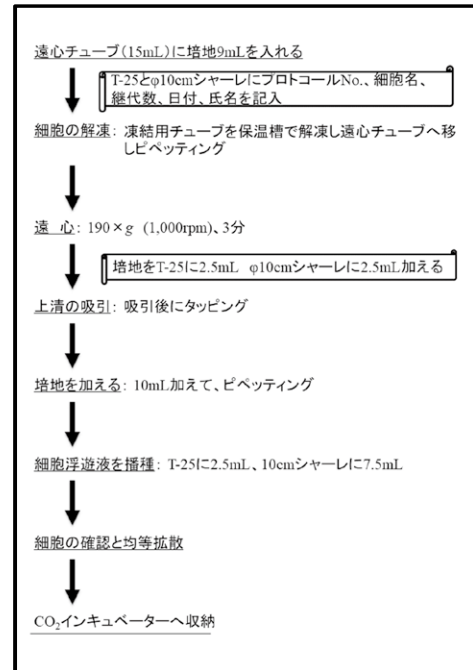


図11-1 『細胞の解凍と培養』のプロチャート

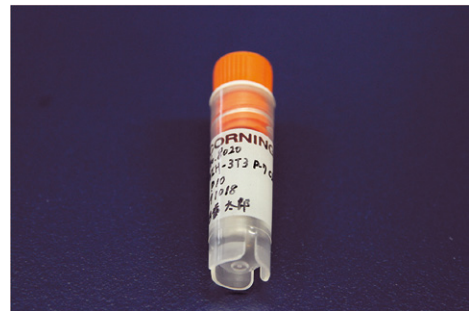


図11-2 凍結用チューブ

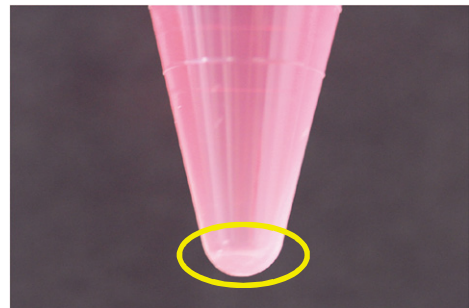


図11-3 細胞ペレット



## 4. 細胞の継代・細胞計測

### Key points

- ①顕微鏡で細胞が剥がれる様子を観察
- ②細胞ペレットをタッピング
- ③細胞をよく分散
- ④細胞の状態を顕微鏡で確認

### 1 器具・試薬

#### 1) 器具

- ・ピペッター
- ・パスツールピペット
- ・ディスポーザブルピペット (1 mL × 1、2 mL × 1、5 mL × 5、10 mL × 1)
- ・25 cm<sup>2</sup> フラスコ (T-25) × 1
- ・遠心チューブ (15 mL × 1)
- ・マイクロチューブ (1.5 mL × 1)
- ・チューブ立て
- ・細胞計数盤
- ・カウンター
- ・氷

#### 2) 試薬

- ・培地 (室温)
- ・PBS(-)
- ・トリプシン・EDTA
- ・0.4% トリパンブルー / PBS(-)

### 2 プロトコール (図12-1)

#### (1) 細胞を観察する。

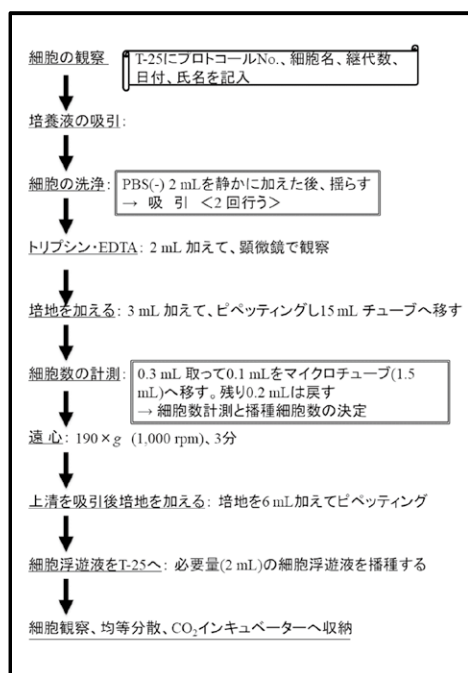


図12-1 『細胞の継代・細胞計測』のプロトコール

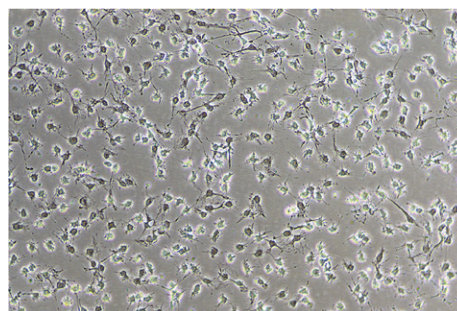


図12-2 トリプシン・EDTA添加後

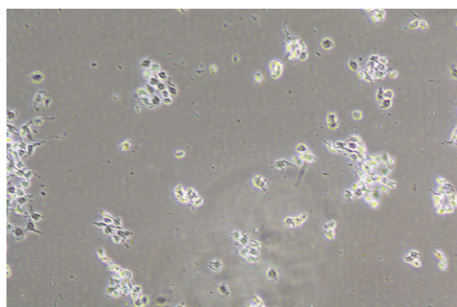


図12-3 トリプシン・EDTA添加し、揺すった後

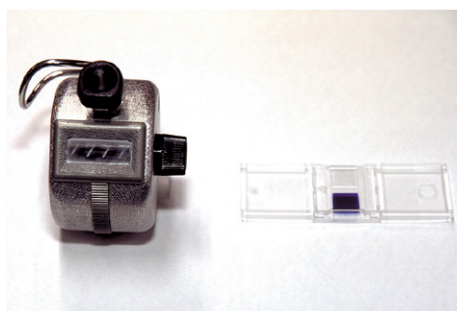


図12-4 カウンターと細胞係数盤

- (2) フラスコを消毒用アルコール綿で清拭し、クリーンベンチ内へ移動する。
- (3) フラスコ内の培地を吸引する。
- (4) PBS(-) 2 mLを静かに加えて、細胞表面を洗浄する。
- (5) PBS(-)を吸引する。
- (6) 手順 (4)、(5) を2回行う。
- (7) トリプシン・EDTAを2 mL加えて、室温で放置 (約60~90秒) する (図12-2 ~図12-3)。
- (8) 顕微鏡で細胞が剥がれる様子を観察する。
- (9) 大部分の細胞が球状になったら、少し消毒用アルコール綿などで蓋およびその周辺をよく拭き、クリーンベンチに戻す。
- (10) 培地を3 mL加えて静かにピペッティングし、フラスコに残っている細胞を極力

剥がす。

- (11) フラスコに細胞を残さないように、細胞浮遊液全量を15mLチューブへ移す。
- (12) 細胞浮遊液100  $\mu$ Lを1 mLピペットでマイクロチューブへ移す(細胞数計測用、氷中)。
- (13) 15mLチューブを遠心分離する。(190  $\times$  g [1,000rpm]、3分)
- (14) 細胞係数盤に流し込んだ後、5分で細胞数を計測する。(図12-4～図12-6)
- (15) 遠心後、細胞ペレットを確認し、パストゥールピペットで上清を静かに吸引する。

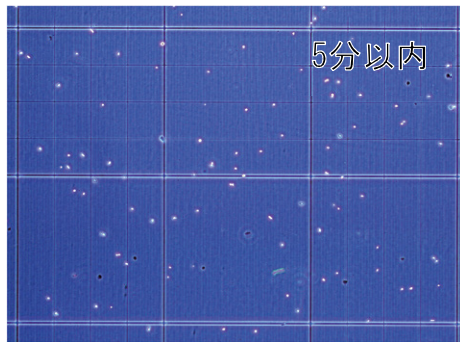


図12-5 細胞計数盤に流し込んだ後の細胞の状態(5分以内)

- (16) フラスコへ必要量の培地を加える。
- (17) 細胞ペレットをタッピングでほぐす。
- (18) 手順(18)の15mLチューブに培地を5 mL加えて、ピペッティングし必要量の細胞浮遊液をフラスコへ播種する。
- (19) プロトコールNo.、細胞名、継代数、日付、氏名を油性ペンで上面に記入する。(フラスコは横、シャーレは細胞を播種する容器の側面にも記載する)
- (20) 細胞をよく分散する。
- (21) 細胞状態を顕微鏡で確認し、CO<sub>2</sub>インキュベーターで培養する。

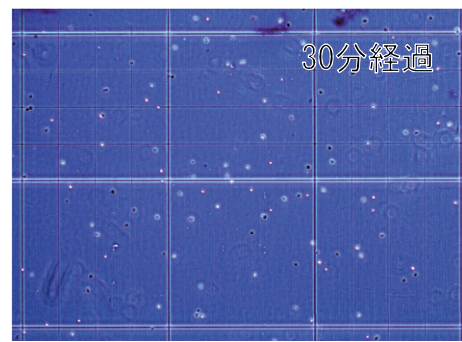


図12-6 細胞計数盤に流し込んだ後の細胞の状態(30分経過)

## 5. 細胞の凍結保存

- ①顕微鏡で細胞が剥がれる様子を観察
- ②凍結する細胞数に合わせて、10%DMSO/培地を調整
- ③細胞ペレットをタッピング
- ④ピペッティングし凍結用チューブへ

### Key points

#### 1 器具・試薬

##### 1) 器具

- ・ピペッター
- ・パストゥールピペット
- ・ディスポーザブルピペット(1 mL  $\times$  3、2 mL  $\times$  3、5 mL  $\times$  4)
- ・25 cm<sup>2</sup> フラスコ (T-25)  $\times$  1
- ・遠心チューブ (15 mL  $\times$  1)
- ・チューブ立て
- ・細胞計数盤
- ・カウンター
- ・凍結用チューブ  
(プロトコールNo.、細胞名、継代数、細胞数、凍結年月日、氏名を記入)
- ・凍結用断熱容器

#### 2) 試薬

- ・10%DMSO/培地 (室温)
- ・PBS(-)
- ・トリプシン・EDTA
- ・0.4% トリパンプルー/PBS(-)

#### 2 プロトコール (図13-1)

- (1) 細胞を観察する。
- (2) フラスコをアルコール綿で清拭し、クリーンベンチ内へ移動する。
- (3) フラスコ内の培地を吸引する。
- (4) PBS(-) 2 mLを静かに加えて、細胞表面を洗浄する。
- (5) PBS(-)を吸引する。
- (6) 手順(4)、(5)を2回行う。
- (7) トリプシン・EDTAを2 mL加えて、室温で放置(約60～90秒)する。
- (8) 顕微鏡で細胞が剥がれる様子を観察する。
- (9) 大部分の細胞が球状になったら、少しフラスコを揺する。
- (10) 消毒用アルコール綿で蓋およびその周辺をよく拭き、クリーンベンチに戻す。
- (11) 培地を5 mL加えて静かにピペッティン



グし、フラスコに残っている細胞を極力剥がす。

- (12) フラスコに細胞を残さないように、細胞浮遊液を15 mLチューブへ移す。
- (13) 1 mLピペットで 細胞浮遊液100  $\mu$  Lをマイクロチューブへ移す。(細胞数計測用、氷中)
- (14) 15 mLチューブを遠心する。(190 $\times$ g [1,000rpm]、3分)
- (15) 遠心中、細胞数を計測する。
- (16) 細胞数に合わせて10%DMSO/培地を調整する。
- (17) 遠心後、細胞ペレットを確認し、パストールピペットで上清を静かに吸引除去する。
- (18) 細胞ペレットをタッピングでほぐす。
- (19) 10% DMSO/培地をサンプルに加えて、ピペッティングし凍結用チューブへ1 mLずつ分注する。
- (20) 凍結用断熱容器に凍結用チューブを入れて、 $-80^{\circ}\text{C}$ フリーザーに一晩置く。
- (21) 液体窒素凍結細胞保存容器に収納する。(図13-2～図13-3)

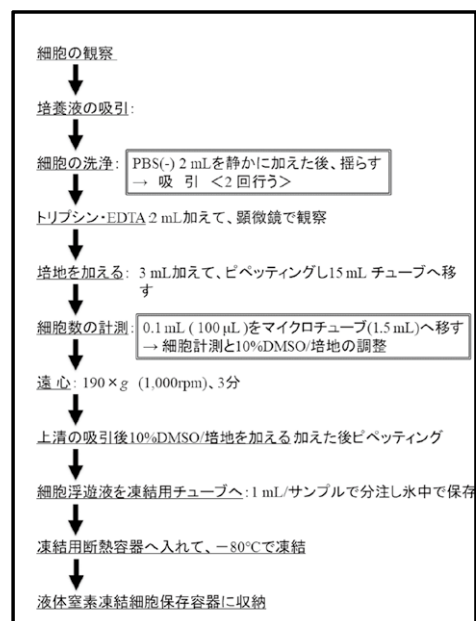


図13-1 『細胞の凍結保存』のフロチャート



図13-2 液体窒素凍結細胞保存容器

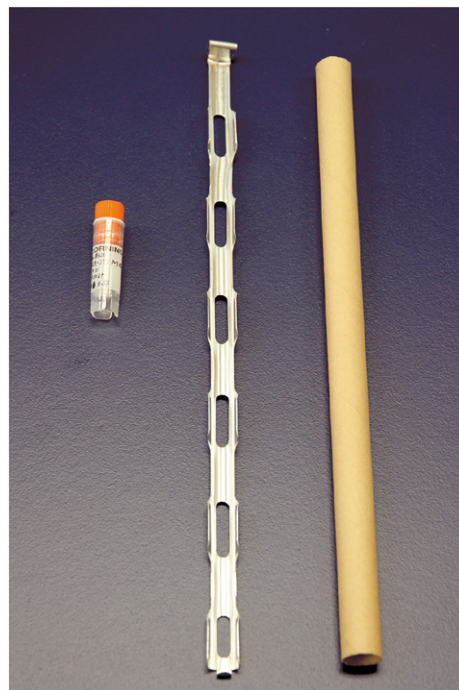


図13-3 凍結用チューブ、クライオケーン、カバー

## 6. アンケート

今後の研究力増進プログラム実習資料のため、細胞培養基礎実習前と実習後にアンケートを実施した。

(事前実習) (2017年度 回答16名、無回答2名、2018年度 回答6名)

## A-1 講習時間 (1時間30分)

1. 丁度いい 2. 長い 3. 短い 4. 受けてよかった 5. 受けなくてもよかった (1. 4. が22名)

## A-2 ピペッターの使い方

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

## A-3 マイクロピペットの使い方

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

## A-4 細胞計数盤の使い方

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

(細胞培養基礎実習)

## B-1 実習の内容 (項目)

1. 期待した内容ではなかった 2. 一部は期待した内容だった 3. 適当だった 4. 良い内容だった 5. その他 (4. が22名)

## B-2 講習時間 (2日間、1日目10:00-17:00、2日目9:00-17:00)

1. 丁度いい 2. 長い 3. 短い (1. が20名、2. が2名)

## B-3 講義

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

## B-4 細胞の観察・培地の交換

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

## B-5 細胞の解凍と培養

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

## B-6 細胞の継代・細胞計測

1. わかりやすかった 2. わかりにくかった (1. が22名)

[今後に向けて]

## C-1 細胞培養の研究を予定していますか

1. 予定している 2. 予定していない  
(予定している 10名 (所属講座、共同研センターの培養室で行う))

## 考 察

細胞培養は再現性、信頼性の確保が重要である。そのためには培養作業者の細胞培養技術が一定の水準を維持する必要がある。日本組織培養学会は細胞培養技術の標準化を目指し、「細胞培養基盤技術コース」を開催している<sup>1), 2)</sup> (古江・楠田 2019、筒井・江藤他 2020)。今回の実習でチーフ・インストラクターを務めた筒井、江藤は、日本組織培養学会における細胞培養指導士認定制度の企画責任者、細胞培養指導士であり、この細胞培養基礎実習は日本組織培養学会が提唱する細胞培養法に準じて行った。なお、インストラクターの小林は2019年に学会が認定する細胞培養士の資格を得ている。

参加者の多くは細胞培養が初めての大学院生であった。細胞培養の操作では正確な細胞浮遊液の攪拌、分注操作が重要であるため、実際の細胞を用いた実習の前に、事前実習としてピペットコントローラー、マイクロピペットの取り扱い、さらに速やかに作業が進むように細胞計数盤を用いた細胞計数方法の講習を行った。参加者は練習を重ねるごとに徐々に正確な操作が可能になった。アンケートでは回答者22名が事前講習を受けてよかったと回答している。初心者が細胞培養の実習に参加するにあたり、ピペットコントローラー、マイクロピペット操作の訓練は不可欠であった。

細胞培養法全体を理解してもらうために、実技講習の前に細胞培養の操作、設備、機器、試薬等の基本を筒井が講義した。アンケート回答者全員がわかりやすい内容だったと回答している。

+実技講習の内容は(1)無菌操作、(2)細胞の観察(増殖の認識)、(3)細胞の解凍、(4)細胞の凍結、(5)培地交換、(6)細胞密度と継代、(7)細胞数の計測、(8)機器類の使用であった。実技に関するアンケートでは細胞の観察・培地の交換、細胞の解凍と培養、細胞の継代・細胞計測で回答者全員がわかりやすかったと回答している。今回の研究力増進プログラム－細胞培養基礎実習－はデモンストレーションと各操作の機会が1回ずつであったがすぐに実践できる。これから細胞培養を用いて実験する際、基本操作を繰り返し行い、各々の操作のチェックポイントを確認しながら進めていただきたい。

さらに、今後の研究力増進プログラムに要望があった。細胞培養のアドバンスコース (stem cellの培養法、組織からの細胞抽出法など)、論文に良く出てくる手技 (組織・細胞の免疫染色、蛍光免疫染色、フローサイトメトリー、PCR、

ELISA 法など) の講義と実習、研究センターにある顕微鏡などの使い方、細胞実験の講演会、細菌培養、組織標本の作り方、硬組織切片の作り方、電顕の観察方法等であり、順次開催する予定である。

#### 参考文献

古江-楠田美保: 本当に知ってる? 細胞を培養する方法 (古江-楠田美保編), 株式会社じほう, 東京, 2019, ISBN 978- 4 -8407-5209- 1 .  
筒井健夫、江藤哉子他: 細胞培養実習テキスト 第 2 版 (日本組織培養学会編), 株式会社じほう, 東京, 2020, ISBN 978- 4 -8407-5292- 3 .